

人类口腔菌的一个新属

平文祥 周东坡 孙剑秋 范春明

(齐齐哈尔大学师范学院生物系 齐齐哈尔 161006)

丁迎春

(齐齐哈尔市第二医院 齐齐哈尔 161006)

关键词 口腔链球菌属, 微嗜盐口腔链球菌, 牙周病

分类号 R372

牙周病是人类的一种常见病, 多发病, 其致病菌具有多样性和复杂性, 有关该病的致病菌和病因学的研究, 对防治工作具有重要意义。作者从牙周病患者的病灶处分离到了一株细菌(90-1), 并对其进行了鉴定, 现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌株

分离菌株的样品, 取自牙周病患者的病灶处。

1.2 培养和分离

培养和分离均采用 CM⁺ 培养基(%): 酵母膏 2, 葡萄糖 0.5, 蛋白胨 1, 牛肉膏 0.5, NaCl 2, pH7.2。固体培养基加琼脂 2%。

经在 CM⁺ 固体培养基上反复划线分离纯化, 取单菌落进行鉴定。

1.3 鉴定方法

主要按文献 [1, 2] 的方法进行。

1.3.1 形态特征观察:

个体形态: 将已充分活化的待鉴定菌株在 CM⁺ 液体培养基中 37℃ 培养 18h。进行革兰氏染色(用已知革兰氏阳性菌和阴性菌混合涂片作对照), 然后在光学显微镜下观察细菌细胞的形状、菌体大小。

鞭毛染色采用银染法进行^[2]。将待鉴定的菌株在新制备的 CM⁺ 斜面上连续移种 4~5 次, 每次培养 18~24h, 然后用接种针将其点种于 CM⁺ 半固体平皿上, 22℃ 下培养 12~18h, 取其菌落边缘菌体进行鞭毛染色, 镜检并进行显微摄影。

菌落形态: 将活化菌种稀释后涂布于 CM⁺ 平皿上, 倒置于 37℃ 恒温箱中培养 48h 观察菌落形态, 并用游标卡尺测量菌落大小。

液体培养特征: 将待鉴定菌种接于 CM⁺ 液体培养基中, 适温培养 24~48h, 观察生长状态。

1.3.2 生理生化特性测定:

生长温度: 将已活化的待测菌株用微量接种法接于 CM^+ 液体中, 分别置于 4、10、28、30、33、35、37、45、53℃ 的恒温恒湿人工气候箱和恒温箱中培养, 48h 后, 用 75-2UV 分光光度计在波长 570 nm 下测量其培养液 OD 值, 以确定其最适、最高、最低生长温度; 将活化的菌液经 60℃、30min 超级恒温水浴处理之后, 涂皿培养, 观察其生长情况, 以确定其耐热性。

需氧性的测定: 参照 Cappuccino^[3] 的方法进行培养试验; 参照改良的焦性没食子酸法进行试验^[4]; 参照王大相^[1] 的试管穿刺法进行需氧性测定。

耐盐能力的测定: 在分别加入 0.5%、1%、2%、6.5%、10%、15%、20%、25%、30% 的 NaCl 的 CM^+ 培养液中, 接入已活化的菌种, 适温培养 3d 测量 OD_{570} 值, 确定其最适的盐浓度和耐盐性。

耐酸碱度试验: 将活化的菌种分别转接于 pH 值为 3.5、4.5、5.0、5.5、6.2、6.8、7.2、7.6、8.0、9.0、9.6 的 CM^+ 培养液中, 适温培养 3d 后, 测量菌体的生长量, 确定其最适的 pH 值及耐酸碱的结果。

糖和醇类的发酵: 参照文献 [4] 的方法, 在 TYE 的培养基中, 分别加入终浓度为 1% 的葡萄糖、棉子糖、阿拉伯糖、果糖、鼠李糖、山梨糖、山梨醇、麦芽糖、蔗糖、菊糖、乳糖、半乳糖、木糖、甘露糖, 接种后 37℃ 培养 1、2、4、7、14d 观察结果。

酶的测定: 接触酶试验、氧化酶、精氨酸双水解酶试验参照文献 [1] 的方法进行; 苯丙氨酸脱氨酶试验参照 Gowtcharoff^[5] 的方法进行; β -半乳糖苷酸试验、脲酶、血浆凝固酶试验参照 Mac Fadding^[6] 的方法进行。

大分子水解试验: 淀粉、糊精、纤维素水解试验、明胶液化试验、七叶苷、胆汁七叶苷、胆汁水解、酪素水解试验参照文献 [1] 的方法进行。

美蓝牛奶、溶菌酶及奥普托辛和呋喃唑酮的抗性测定: 参照文献 [6~7] 的方法, 测定菌体对 0.1%、0.3% 的美蓝牛奶, 对 25 μ g/ml、100 μ g/ml 溶菌酶及奥普托辛和呋喃唑酮药敏片的抗性。

其他生理生化特性的测定: 吲哚试验、甲基红试验、VP 试验、柠檬酸盐试验参照文献 [3] 的方法进行; H_2S 试验、石蕊牛奶试验、硝酸盐还原试验、丙二酸盐试验参照文献 [1] 的方法进行; cAMP 溶血试验、果聚糖形成试验、溶血环试验参照文献 [1, 6, 7] 的方法进行。

1.3.3 动力学试验: 参照文献 [6] 的方法, 用悬滴法、半固体穿刺法和半固体培养基表面菌落扩散法进行测定。

1.3.4 血清学试验: 使用日本株式会社的链球菌 A、B、C、D、F、G 六种诊断血清和哈尔滨防疫站制的各群诊断血清, 做乳胶玻片凝集法试验。

1.3.5 DNA 中 G+C 含量的测定: 用岛津 UV-250 型紫外分光光度计, 以大肠杆菌 AS 1.365 作对照菌, 通过 Tm 值法进行测定。

2 结果

2.1 形态特征

2.1.1 个体形态: 90-1 菌株细胞呈球形, 多成对排列, 有少数单个或四个细胞相连的短链状。直径为 0.9~1.5 μ m。具有单生鞭毛, 革兰氏染色阳性。其菌体形态和鞭毛着生情况见图 1。

2.1.2 菌落形态: 在 CM^+ 固体平皿上, 菌落较小, 呈圆形, 中央稍隆起, 边缘不很整齐, 乳白色不透明, 较粘湿润而有光泽, 直径 1~2.8mm, 易刮取; 在 CM^+ 半固体平皿上, 菌落扩展较大, 形状不规则、边缘多缺刻, 与不具鞭毛的菌的菌落有着明显的差别, 可间接证明该菌具有运动性。培养几日后呈淡黄色。

2.1.3 液体培养特征: 在 CM^+ 液体中静止培养 2d 后可形成沉淀, 长时间培养也可形成菌膜。

2.2 生理生化特性

2.2.1 生长温度: 该菌株最适的生长温度为 $35\sim 37^\circ C$, $15^\circ C$ 和 $53^\circ C$ 下生长, $10^\circ C$ 以下不生长。能耐 $60^\circ C$ 30min 的热处理。

2.2.2 需氧性测定: 用改良的焦性没食子酸法厌氧培养该菌生长; 在 CM^+ 固体管中培养呈较均匀的分布生长, 在固体管中穿刺培养, 形成漏斗状生长区。故该菌属兼性厌氧菌。

2.2.3 耐盐能力测定: 经对培养液的光密度 (OD_{570}) 测定得知, 90-1 菌株在 $10\%\sim 15\%$ NaCl 浓度的培养基中可较好地生长, 在 25% NaCl 浓度培养基中也能缓慢生长, 但在 30% NaCl 的培养基中几乎不生长, 最适盐浓度为 2% (图 2)。

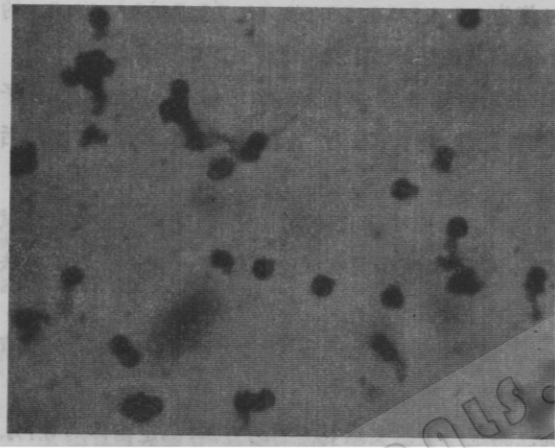


图1 90-1菌株的菌体形态($\times 3000$)

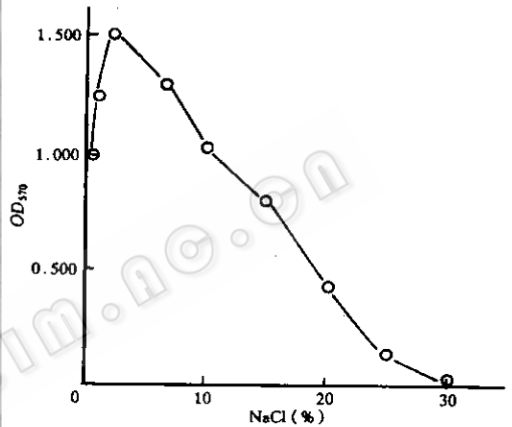


图2 NaCl浓度对90-1菌株生长的影响

2.2.4 耐酸碱度测定: 对不同 pH 值培养基中生长物, 测定其光密度 (OD_{570}) 得知, 该菌株的最适 pH 值为 $7.2\sim 8.0$, 在 pH6.8 和 pH9.6 的条件下均能良好生长, 但在 pH5.0 以下不生长。

2.2.5 糖和醇类的发酵: 该菌株氧化并发酵利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、果糖、甘露糖、木糖产酸但不产气; 只氧化而不发酵甘露醇; 不能利用阿拉伯糖、棉子糖、山梨糖、鼠李糖、山梨醇、菊糖、半乳糖。

2.2.6 酶的测定: 该菌株接触酶、脲酶、精氨酸双水解酶、 β -半乳糖苷酶试验反应阳性; 氧化酶、苯丙氨酸脱氨酶试验反应阴性。

2.2.7 大分子水解试验: 该菌株能缓慢液化明胶; 不水解淀粉、糊精、纤维素、酪素、七叶苷、胆汁七叶苷、胆汁。

2.2.8 美蓝牛奶、溶菌酶及奥普托辛和呋喃唑酮的抗性测定: 该菌株可在 0.1% 与 0.3% 的美蓝牛奶中含 $25\mu g/ml$ 溶菌酶的培养基中生长, 但不能在含 $100\mu g/ml$ 溶菌酶的培养基中生长; 对奥普托辛不敏感而对呋喃唑酮敏感。

2.2.9 其他生理生化特性的测定: 该菌株甲基红、柠檬酸盐、硝酸盐还原试验均为阳性; 吡啶、 H_2S 、石蕊牛奶、VP、丙二酸盐、果聚糖形成、cAMP 溶血试验均为阴性; 在含人血的平皿中培养能形成 β 溶血环。

2.3 动力学试验

悬滴法观察可见菌体运动; 半固体穿刺形成绒毛状生长线, 半固体平皿表面可见菌落扩展, 可证明具有运动性。

2.4 血清学试验

该菌株血清学试验结果均为阴性。

2.5 DNA 中 G + C 含量

该菌株 DNA 的 Tm 值为 70.8℃，G + C 含量平均为 41.34mol%。

3 讨论

在《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9》^[8]中，将细胞为球形、革兰氏阳性、不形成内生孢子的细菌划归为第十七群(Gram Positive Cocci)中，90-1 菌株符合这一群的特征，故其分类地位应属于第十七群的研究范畴。

在第十七群中，根据对氧的需要，划分为三大类，即好氧菌、兼性厌氧菌和专性厌氧菌。90-1 菌株由于兼性厌氧、有鞭毛能运动，接触酶阳性，而与专性厌氧的 5 个属 (*Coprococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Sarcina*) 有明显差异；在兼性厌氧的 13 个属中，除均无鞭毛 (*Enterococcus* 除外) 不运动与 90-1 有明显差别之外，在 DNA 中 G + C 含量方面与 90-1 菌株无明显差异或相接近的属有 *Aerococcus* (34mol%~40mol%)，*Enterococcus* (34mol%~42mol%)，*Lactococcus* (38mol%~40mol%)，*Leuconostoc* (38mol%~44mol%)，*Pediococcus* (34mol%~42mol%)，*Streptococcus* (34mol%~46mol%)。其中，由于 90-1 与 *Streptococcus* 的血清学反应均为阴性，且 *Streptococcus* 的接触酶反应又为阴性，故 90-1 易和 *Streptococcus* 属相区别；与其余的 5 个属的主要特征也具有明显的差异 (表 1)。

表1 90-1菌株与5个兼性厌氧属的差别*

特 征	90-1	气球菌属 <i>Aerococcus</i>	肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	明串珠球菌属 <i>Leuconostoc</i>	片球菌属 <i>Pediococcus</i>
菌体排列方式	多成对	四联、成对	成对、链状	成对、短链	成对、链状	四联、有些成对
鞭毛、运动性	+	-	d	-	-	-
接触酶	+	-	-	-	-	-
生长温度						
10℃	-	+	+	+	+	ND
45℃	+	-	+	-	-	D
最适温度(℃)	35~37	30	37	30	20~30	25~40
在pH9.6时的生长情况	+	+	+	-	ND	D
在6.5%NaCl中生长	+	+	+	-	d	D
在40%胆汁中生长	-	+	+	D	ND	D
硝酸盐还原	+	-	-	-	-	-
明胶液化	+	-				
糖的利用	氧化发酵	氧化	发酵	发酵	发酵	发酵
兰斯菲尔德	-		有的是D组	N组		
血清学反应						

* d 11%~89%的菌株阳性；D种的实际比例不同；ND未确定。

在好氧的 6 个属中，除兼性厌氧和运动性这两个特点外，G+C 含量方面 90-1 菌株也与 *Delnobacter* (69mol%)，*Neinococcus*(62mol%~70mol%)，*Micrococcus*(64mol%~75mol%)，*Salinicoccus*(51mol%) 有

明显差异。

在第十七群中,运动性是不常见的,到目前为止,仅发现好氧的 *Marinococcus* 和 *Planococcus* 属和兼性厌氧的 *Enterococcus* 的某些种具有运动性。因此,在这一群中运动性的有无,就成为鉴定的一个主要特征。然而 90-1 与 *Marinococcus* 和 *Planococcus* 属在其他主要特征方面也有着明显差异,其主要特征比较见表 2 (*Enterococcus* 与 90-1 的差别已在上文中做了比较,其接触酶为阴性,10℃ 下可生长,40% 的胆汁中也可生长,硝酸盐还原阴性等均有明显差异,血清学反应多数种也不同)。

表2 90-1菌株与海洋球菌属和动性球菌属的比较

特 征	90-1菌株	海洋球菌属 <i>Marinococcus</i>	动性球菌属 <i>Planococcus</i>
需氧性	兼性厌氧	好氧	好氧
专性嗜盐 (生长需7.5%NaCl)	-	+	-
利用糖产酸	+	-	-
鞭毛	一根	几根	一或两根
硝酸盐还原	+	+或-	-
DNA中G+C mol%	41.34	44~47	39~52

注: *Planococcus* 几乎不能利用糖类。

此后,1995 年从活性污泥中分离到的 *Micrococcus phosphorus* gen. nov. sp. nov.^[9] 虽也属 G⁺ 球菌,但因其为专性好氧,化能自养,DNA 中 G + C 高达 67.9mol%, 极易与 90-1 菌株相区别;1995 年来自临床病料中的 *Helcococcus* gen. nov.^[10] 的接触酶阴性,1994 年分离出的 *Luteococcus japonicus* gen. nov. sp. nov.^[11] 不运动,DNA 中 G + C 为 67mol%; *Kineococcus auraliacus* gen. nov. sp. nov.^[12] 与 *Roseococcus thiosulfatophilus* gen. nov. sp. nov.^[13] 等为好氧菌,且 DNA 中 G + C 含量均高于 70.0mol%; 1993 年发现的 *Polezaria aurantia* gen. nov. sp. nov.^[14] 其生长温度范围(42℃ 不生长)与 DNA 中 G + C(59mol%)等均与 90-1 菌株易于区别; *Lautropia mirabilis* gen. nov. sp. nov.^[15] 虽也是从人类口腔中分离到的一种动性球菌,但因其为 G⁻。且鞭毛是 3~9 根成束,DNA 中 G + C 为 65.0mol%, 显然与 90-1 菌株不属于同一群。

综上所述,我们认为 90-1 菌株应定为一个新属,根据其来源定名为口腔链球菌属,并根据其嗜盐性,命名为微嗜盐口腔链球菌(*Stomatostreptococcus microhalophilus* Ping, Zhou, Sun et Fan gen. nov. sp. nov.)。

致谢 本工作得到中国科学院微生物研究所蔡妙英研究员指导;牛志芳、赵威同志参加了部分工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 王大帮. 细菌分类基础. 北京: 科学出版社, 1997. 101~111; 130~178.
- [2] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978. 98~193.
- [3] Cappuccino J G, Natalie S. Microbiology — A Laboratory Manual. Massachusetts: Addison-wesley Publishing Co, 1983. 11~113.

- [4] 周东坡, 平文祥, 宋秀娟, 等. 微生物学报, 1989, 29(2): 79~83.
- [5] Gowtharoff N. (徐浩译). 异养细菌的鉴定的检索与方法. 北京: 科学出版社, 1974. 44.
- [6] Mac Faddin J F (林万明译). 医学细菌生化试验鉴定手册. 北京: 人民卫生出版社, 1985. 50~58; 162~164; 228~235.
- [7] 刘恭植主编. 微生物学和微生物检验. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 66~79.
- [8] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A *et al.* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. 527~557.
- [9] Nakamura K, Hiraishi A, Yoshimi Y *et al.* International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 15(1): 17~22.
- [10] Galiendo A M, Jordan C D, Ruoff K L. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(6): 1638~1639.
- [11] Tamura T, Takeuchi M, Yokota A. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(2): 348~356.
- [12] Yokota A, Tamura T, Nishii T *et al.* International Journal of Systematic Bacteriology, 1993, 43(1): 52~57.
- [13] Yurkov V V, Gorlenko V M. Mikrobiologiya, 1991, 60(5): 902~907.
- [14] Poston J M. Archives of Microbiology, 1993, 160(2): 114~120.
- [15] Gerner S P, Keiser N H, Dorsch M *et al.* Microbiology (Reading), 1994, 140(7): 1787~1797.

A NEW GENUS OF ORAL BACTERIA IN HUMAN

Ping Wenxiang Zhou Dongpo Sun Jianqiu Fan Chunming

(Department of Biology, Teacher's College, Qiqihar University, Qiqihar 161006)

Ding Yingchun

(No. 2 Hospital of Qiqihar, Qiqihar 161006)

Abstract A strain, No. 90-1, is isolated from the oral cavity of a patient with periodontophthy. This strain is a Gram-positive, non-endospore-forming, facultative anaerobe with spherical cells, 0.9~1.5 μ m in diameter, occurring in pairs and seldom in short chains of four cells, and motile by one flagellum per cell. The optimum growing temperature is 35~37 $^{\circ}$ C; appreciable growth is not found below 10 $^{\circ}$ C, but growth at 53 $^{\circ}$ C and tolerant to 60 $^{\circ}$ C for 30min. This strain is microhalophilous and grows best, well and poorly in the medium containing 2%, 10%~15% and 25% NaCl respectively. Catalase and urease are positive and nitrate is reduced. Acid is produced from many carbohydrates, but no gas. Gelatin can be hydrolyzed, but starch, cellulose and dextrin do not. G + C content in DNA is 41.34mol%(Tm). The strain(90-1) is considered to be a new species belonging to a new genus because its some characteristics are different from those of the known coccus genera and designated as *Stomatostreptococcus microhalophilus* Ping, Zhou, Sun et Fan gen. nov. sp. nov. according to its source and microhalophilic trait.

Key words *Stomatostreptococcus*, *Stomatostreptococcus microhalophilus*, Periodontophthy